



MTHFR、MTRR 基因多态性与反复流产的相关性分析

戚桂杰¹, 易建平^{1*}, 周爱文², 谷孝月¹, 张志慧¹

(1. 唐山市妇幼保健院产前诊断中心, 河北 唐山 063000; 2. 河北省卫计委综合监督执法局)

摘要: 目的 探讨叶酸代谢相关基因5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶 (MTHFR)、甲硫氨酸合成酶还原酶 (MTRR) 多态性与反复流产的关系, 分析基因多态性对红细胞叶酸水平的影响。方法 选取2016年12月至2018年6月来唐山市妇幼保健院遗传咨询门诊, 要求进行常规孕产检查, 汉族非妊娠健康女性424例为研究对象。依据不良孕产史分为两组, 其中病例组216例和对照组218例。采集静脉血, 提取DNA, 荧光定量PCR法进行MTHFR、MTRR基因多态性检测。化学发光法进行红细胞叶酸定量检测。采用SPSS19.0软件进行统计学分析。比较两组MTHFR、MTRR基因多态性分布频率、不同基因型红细胞叶酸水平。探讨基因多态性、红细胞叶酸水平与反复流产的关系。结果 MTHFR A1298C和MTRR A66G两位点多态性在病例组和对照组间的分布, 差异无统计学意义。MTHFR C677T位点多态性, 在病例组中的分布频率明显高于对照组, 差异具有统计学意义。病例组中MTHFR C677T位点TT型基因突变的患者红细胞叶酸水平远低于正常和杂合型。结论 MTHFR C677T 基因突变与反复流产的密切相关, MTHFR C677T 位点TT型基因突变影响机体红细胞叶酸代谢水平。

关键词: 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶; 甲硫氨酸合成酶还原酶; 基因; 多态性; 叶酸; 反复流产

中图分类号: R714.21

文献标识码: A

文章编号: 1006-9534 (2020) 01-0010-04

DOI:10.13404/j.cnki.cjbh.2020.01.004

Association of the gene polymorphisms of MTHFR and MTRR with recurrent spontaneous abortion. *QI Gui-jie¹, YI Jian-ping^{1*}, ZHOU Ai-wen², GU Xiao-yue¹, ZHANG Zhi-hui¹. (1. Prenatal Diagnosis Center Of Tangshan Maternal And Child Health Care Hospital, 063000; 2. Comprehensive Supervision and Law Enforcement Bureau of Hebei Health case and Family Planning Commission)*

Abstract: Objective: To investigate and analyze the correlations between folic acid metabolism related genes methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase reductase (MTRR) polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. To investigate blood folate concentrations and associated factors. Method: Genomic DNA was extracted from peripheral blood and genotyping was performed by real-time PCR. ² test was used to analyze the correlation between folic acid metabolism related genes polymorphisms and recurrent spontaneous abortion results. Results: Compared with normal women, the distribution of MTHFR C677T in RPL women was statistically significant ($P < 0.05$), while the distribution of MTHFR A1298C loci and MTRR A66G loci was not statistically significant ($P > 0.05$). The erythrocyte folic acid level of women with MTHFR C677T was much lower than the women in normal groups and it is statistically significant difference.

Key words: MTHFR; MTRR; Genetic; Polymorphism; Recurrent spontaneous abortion

反复流产 (Recurrent pregnancy loss, RPL) 是指连续发生 2 次及以上的自然流产, 在育龄期妇女中发病率为 1%-2%^[1]。自然流产可能与环境、免疫、遗传等诸多因素有关。目前对于大部分反复流产的原因不明确, 不明原因流产给患者及其家庭带来沉重的负担^[2]。近年来关于叶酸代谢相关基因多态性与反复流产的关系, 成为关注的热点。目前研究发现与叶酸代谢相关基因有十几种, 其中亚甲基四氢叶酸还原酶 (Methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 以及甲硫氨酸合成酶还原酶 (Methionine synthase reductase, MTRR) 是叶酸代谢通路中的关键酶。研究证实相关基因的突变与静脉血栓性疾病、II 型糖尿病、妊娠高血压综合征密切相关。MTHFR、MTRR 基因多态是否与反复流产关系密切尚存在争议。探讨 MTHFR、MTRR 基因多态性有利于进一步了解 RPL 的发病机理, 为临床治疗提

供依据。

本研究通过检测最常见的叶酸代谢相关基因 MTHFR C677T 位点、A1298C 位点和 MTRR A66G 位点多态性, 探讨基因多态性与反复流产的相关性。检测红细胞叶酸水平, 分析基因多态性与红细胞叶酸水平之间的关系, 为围受孕期补充叶酸, 降低反复流产率提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2016 年 12 月至 2018 年 4 月来唐山市妇幼保健院就诊, 要求进行常规孕产检查, 汉族非妊娠健康女性为研究对象。纳入标准: (1) 夫妻双方外周血染色体核型分析正常, 无家族遗传病史。(2) 常规妇科超声检查无生殖器解剖学畸形。(3) 生殖内分泌相关检查正常。(4) 甲状腺功能检查正常。(5) 排除病原体感染等因素。(6) 免疫相关抗体检查均为阴性。(7) 近 3 个月内未进行过任何方式的叶酸、维生素等补充治疗。排除标准: 吸烟、酗酒、高血压、心脏病、糖尿病、血液系统及肝肾疾病史、静脉栓塞病史等。依据既往不良孕史分为两组即病例组: 有 2 次或 2 次以上自然流产史; 对照组: 至少有 1 次成功妊娠史,

课题项目: 1. 《生殖发育异常遗传分析》, 河北省科技进步指导计划, 课题编号: 20150939; 2. 《高通量测序技术临床应用研究》, 河北省引进留学人员资助项目, 项目编号: CY201723

通讯作者: 易建平

少于 2 次流产史、胚胎停育史、胎儿生长受限、宫内死胎病史。两组女性年龄均为 25-34 岁，病例组平均年龄为 (26.30±6.53) 岁，对照组平均年龄为 (26.70±5.69) 岁。

1.2 方法

1.2.1 红细胞叶酸浓度检测：空腹采集静脉血标本 3ml，同时测定样本红细胞比积，用于计算。采用智能红细胞叶酸测定仪 (YS-YS-5300) 磁微粒化学发光法。轻轻颠倒全血样本数次使之充分混匀，取 50μl 全血加入 1ml 溶血剂中 (制备溶血液)，轻轻震荡使溶血样本均匀，室温环境下避光竖直存放 90min 后，在 1.5h 内上机完成测定溶血样本叶酸含量，计算红细胞内叶酸浓度。本方法试剂盒提供的红细胞叶酸正常参考值为 400-800ng/mL。

1.2.2 基因多态性检测：取静脉血 1ml，通过核酸提取和纯化 DNA，采用荧光定量 PCR 仪 (7900HT, ABI)、DNA 测序仪 (3730, ABI)，运用荧光定量 PCR、DNA 测序方法进行基因分析。

1.3 统计学处理

统计学软件采用 SPSS 19.0 软件分析数据，计量资料以均数 ± 标准差表示，组间比较采用 t 检验。计数资料用率表示，组间比较用卡方检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例组与对照组 MTHFR、MTRRM 基因多态性分布特征均符合 HARDY-Weinbeg 平衡定律 (P > 0.05)，说明数据标本的选择来源于同一个孟德尔群体。两组患者年龄无统计学差异 (P > 0.05)。

2.2 MTHFR C677T 位点、A1298C 位点基因型分布频率比较 病例组 216 例中，MTHFR C677T 位点基因型分布频率：CC 型为 93 例 (43%)、CT 型 73 例 (34%)、TT 型 50 例 (23%)；MTHFR C1298A 位点基因型分布频率：AA 型 119 例 (55%)、AC 型 74 例 (34%)、CC 型 24 例 (11%)。对照组 218 例中，MTHFR C677T 位点基因型分布频率：CC 型 108 例 (50%)、CT 型 79 例 (36%)、TT 基因型 31 例 (14%)。MTHFR C1298A 位点基因型分布：AA 型 111 例 (51%)、AC 型 76 例 (35%)、CC 型 31 例 (14%)。两组相比，病例组中 MTHFR C677T 位点 TT 基因型分布频率明显高于对照组，差异具有统计学意义 (P < 0.05)。MTHFR C1298A 位点多态性在两组间的分布差异无统计学意义 (P > 0.05)。见表 1。

表1 MTHFR C677T位点、A1298C位点基因型分布情况

| 基因型 | 病例组 (n=216) | 对照组 (n=218) | ² | P 值 |
|-----------|----------------|----------------|--------------|------|
| 677 位点 | | | | |
| CC (正常) | 93 (43%) | 108 (50%) | 1.84 | 0.18 |
| CT (杂合突变) | 73 (34%) | 79 (36%) | 0.28 | 0.59 |
| TT (纯合突变) | 50 (23%) | 31 (14%) | 5.49 | 0.02 |
| 1298 位点 | | | | |
| AA (正常) | 118 (55%) | 111 (51%) | 0.76 | 0.38 |
| AC (杂合突变) | 74 (34%) | 76 (35%) | 0.17 | 0.89 |
| CC (纯合突变) | 24 (11%) | 31 (14%) | 2.08 | 0.15 |

2.3 MTRR A66G 位点基因型分布频率情况 病例组 216 例中，MTRR A66G 位点基因型分布频率：AA 型 97 例 (45%)、AG 型 78 例 (36%)、GG 型 41 例 (19%)；对照组 218 例中，MTRR A66G 位点基因型分布频率：AA 型 102 例 (47%)、AG 型 70 例 (32%)、GG 型 46 例 (21%)。两组相比，MTHFR C1298A 位点多态性在两组间的分布差异无统计学意义 (P > 0.05)。见表 2。

表2 MTRR A66G位点基因型分布情况

| 基因型 | 病例组 (n=216) | 对照组 (n=218) | ² | P 值 |
|-----------|----------------|----------------|--------------|------|
| AA (正常) | 97 (45%) | 102 (47%) | 0.15 | 0.69 |
| AG (杂合突变) | 78 (36%) | 70 (32%) | 0.44 | 0.61 |
| GG (纯合突变) | 41 (19%) | 46 (21%) | 0.30 | 0.58 |

2.4 病例组中 MTHFR、MTRR 位点不同基因型红细胞叶酸浓度比较 病例组中 MTHFR C677T 位点，TT 型基因携带者红细胞叶酸浓度明显低于 CC 型及 CT 型，差异具有统计学意义 (P < 0.05)。见表 3。

表3 病例组中MTHFR、MTRR不同基因型红细胞叶酸浓度比较

| | 基因型 | 叶酸浓度 (ng/ml) |
|--------------|-----------|---------------|
| MTHFR 677 位点 | CC (正常) | 417 ± 159.34 |
| | CT (杂合突变) | 412 ± 144.32 |
| | TT (纯合突变) | 327 ± 145.64* |
| MTHFR1298 位点 | AA (正常) | 417 ± 155.61 |
| | AC (杂合突变) | 412 ± 175.15 |
| | CC (纯合突变) | 387 ± 155.62 |
| MTRR 66 位点 | AA (正常) | 417 ± 162.66 |
| | AG (杂合突变) | 412 ± 147.15 |
| | GG (纯合突变) | 387 ± 155.37 |

与 MTHFR 基因位点 CC 型及 CT 型相比，* (P < 0.05)

3 讨论

近年来关于 MTHFR、MTRR 基因与反复流产的相关性，一直存在争议。本研究结果表明，MTHFR A1298C 和 MTRR A66G 两位点多态性在正常健康女性和反复流产女性间的分布差异无统计学意义，而 MTHFR C677T 位点 TT 型基因突变在 RPL 人群的分布频率明显升高，差异有统计学意义。这说明 MTHFR A1298C 和 MTRR A66G 基因位点突变与 RPL 无关，而 MTHFR C677T 位点 TT 型基因突变与 RPL 密切相关。基于不同的种族、地域、样本选择的偏差，关于叶酸代谢相关基因与反复流产的关系，研究结果明显不同 [3, 4]。有研究表明 MTHFR 基因多态性与反复流产无明显的相关性 [5]。进一步的研究显示，自然流产 2 次的患者与自然流产 3 次以上的患者相比较，流产的次数和 MTHFR 基因多态性的分布无明显差异 [6]。Abedinzadeh M, et al. 研究发现，虽然 MTHFR C677T 基因突变与 RPL 不相关，但该基因突变与体内高水平的同型半胱氨酸 (Hcy) 密切相关 [7]。一项基于中国人群的大规模的临床研究显示，MTHFR C677T 位点 TT 型基因突变分布频率与反复流产密切相关 [8]。

目前，关于反复流产的机制尚不清楚。近年来研究证

实, 微血栓的形成增加不良妊娠结局的风险, 可能是最终导致胚胎早期流产的重要原因^[9]。研究显示, 基因突变引起的单个碱基的位置变化使凝血酶原水平升高, 增加血栓栓塞的风险。MTHFR、MTRR 是叶酸代谢的关键酶, 叶酸代谢通路参与了细胞 DNA 合成与修复, 连接了表观遗传。MTHFR 基因位点的突变, 能够使酶的活性明显降低, 阻碍细胞 DNA 甲基化传递进程, 纯合突变使酶活性, 从正常效率水平降低约 35%。MTHFR 基因不同位点的杂合突变, 也使酶活性不同程度的下降, 进而导致 HCY 水平增加。虽然 MTHFR A1298C 多态性并不是导致体内同型半胱氨酸增加的直接原因, 但该多态性已被证明对 HCY 水平有重要影响^[7]。血浆 HCY 浓度升高, 导致血管内皮损伤可能是增加血栓栓塞风险的原因^[10]。有研究通过对胎儿发育迟缓、子痫前期、晚期流产胎盘病理分析, 进一步证实微血栓形成明显增加流产的风险。对于高 Hcy 血症并携带 677 位点纯合突变的妇女, 孕前及孕早期叶酸增补剂量每日高达 15mg 能够改善妊娠结局^[11]。Philippe Merviel, et al. 研究发现, 对于携带 MTHFR C667T 位点 TT 型基因突变的反复流产患者, 小剂量阿司匹林治疗有效, 进一步证实 MTHFR C667T 位点基因多态性可能与反复流产有关^[12]。

本研究进一步分析病例组红细胞叶酸水平显示, MTHFR C667T 位点 TT 型基因突变患者的红细胞叶酸水平远低于 CC 型和 CT 型。病例组 MTHFR C667T 位点 TT 型突变的分布频率为 23%, 与 Wolski H, et al. 研究结果一致^[13]。有研究指出, MTHFR 的基因突变不仅影响叶酸的吸收和代谢, 还可能影响叶酸的补充效果。以往的研究多数基于血浆叶酸水平的检测, 由于人体内血清叶酸水平易受近期身体吸收状况、饮食结构等多方面因素的影响。本研究中采用化学发光法检测红细胞叶酸浓度, 可较好地反映一段时间内体内叶酸储备, 不受近期饮食情况的影响, 更能够代表体内叶酸真实水平。作为维生素 B 家族的一员, 叶酸不能在人体内合成, 必须每天补充食物。叶酸的主要生物学功能是作为甲基供体参与脱氧核糖核酸合成和细胞内甲基化反应。叶酸需要被叶酸还原酶激活, 才能发挥其生理功能活动。充分补充叶酸, 维持体内一定的红细胞叶酸浓度, 可以降低 HCY 浓度, 改善血液供应并降低血栓形成的风险, 减少流产、心血管疾病和癌症的风险^[14]。近期的《围受孕期增补叶酸预防神经管缺陷指南》建议对于围受孕期妇女, 尤其有自然流产史患者, 检测叶酸相关基因多态性, 确定叶酸代谢相关基因型, 制定个体化叶酸补充方案^[15-17]。

总之, 本研究证实 MTHFR C677T 位点 TT 型基因突变与反复流产密切相关, 围受孕期妇女进行 MTHFR、MTRR 基因多态性检测, 对于指导和检测叶酸补充, 预防反复流产的发生具有重要意义。建议将 MTHFR C677T 作为早期自然流产的遗传筛选指标, 并依据个人 CT 或 TT 基因型适当增加叶酸的摄入量, 预防流产。

本研究存在一定的不足, 研究样本量的少, 可能导致研究结果的偏倚。只检测了 MTHFR C667T、MTHFR A1298C 和 MTRR A66G 位点, 其他相关基因可能对研究结果存在影响。在今后的研究中, 将扩大样本量, 增加可能影响结果的相关数据进一步分析。

参 考 文 献

- [1] Timeva T, Shterev A, Kyurkchiev S. Recurrent Implantation Failure :The role of the endometrium[J]. J Reprod Infertil, 2014, 15 :173-183.
- [2] Diejomaoh MF. Recurrent spontaneous miscarriage is still a challenging diagnostic and therapeutic quagmire[J]. Med Princ Practice, 2015, 24 :38-55.
- [3] Settin A, Elshazli R, Salama A et al. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in Egyptian women with unexplained recurrent pregnancy loss[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2011, 15 (12) :887-892.
- [4] Yang B, Liu Y, Li Y, et al. Geographical distribution of MTHFR C677T, A1298C and MTRR A66G gene polymorphisms in China : findings from 15357 adults of Han nationality[J]. PLoS One, 2013, 8 (3) :e57917.
- [5] Hu X, Liang P, Diao L. The association of methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation with unexplained recurrent miscarriage[J]. Chin J Birth Health Hered, 2014, 11 :87-89.
- [6] Gi Su L, Joon CP, Jeong HR, Jong IK. Etiologic characteristics and index pregnancy outcomes of recurrent pregnancy losses in Korean women[J]. Obstet Gynecol Sci, 2016, 59 (5) :379-387.
- [7] Abedinzadeh M, Zare-Shehneh M, Neamatzadeh H, et al. association between MTHFR C677T polymorphism and risk of prostate cancer :Evidence from 22 studies with 10,832 cases and 11,993 controls[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16 (11) :4525-4530.
- [8] Hui Mo, Meng Rao, Gang Wang, et al. Polymorphism of MTHFR 1298A>C in relation to adverse pregnancy outcomes in Chinese populations[J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, e642.
- [9] Chedraui P, Andrade ME, Salazar-Pousada D, et al. Polymorphisms of the methylenetetrahydrofolate reductase gene (C677 T and A1298C) in the placenta of pregnancies complicated with preeclampsia [J]. Gynecological Endocrinology, 2015, 31 (7) :569-572.
- [10] Park WC, Chang JH. Clinical Implications of Methylenetetrahydrofolate Reductase Mutations and Plasma Homocysteine Levels in Patients with Thromboembolic Occlusion[J]. Vasc Spec Int, 2014, 30 :113-119.
- [11] Nowak I, Malinowski A, Barcz E, et al. Possible role of HLA-G, LILRB1 and KIR2DL4 gene polymorphisms in spontaneous miscarriage[J]. Arch Immunol Ther Exp, 2016, 64 :505-514.
- [12] Philippe Merviel, Rosalie Cabry, Emmanuelle Lourdel, et al. Comparison of two preventive treatments for patients with recurrent miscarriages carrying a C677T methylenetetrahydrofolate reductase mutation :5-year experience[J]. Journal of International Medical Research, 2017, DOI :10.1177/0300060516675111
- [13] Wolski H, Kocięcka M, Mrozikiewicz AE, et al. Coexistence of the 677C>T and 1298A>C MTHFR polymorphisms and its

(下转第114页)

等因素的影响，儿童弱视的发生率不断提升，弱视的治疗原则在于早发现、早干预，0~3岁儿童正处于视力发育的关键阶段，加强对该阶段儿童的视力筛查，可以及时发现弱视情况，尽早实施干预。屈光不正正是致使儿童弱视的一个主要原因，因此，及时了解儿童的屈光情况至关重要。而学龄前的儿童年龄小，进行瞳验光难度较大，Suresight 视力筛查仪的优点在于无须散瞳即可进行屈光检查，适用于6个月以上各个年龄段的人群，无须检查者进行主观反应，适用于儿童检查。另外，检查时间短，参考依据简单、有效，适用于大面积筛查，可有效节省时间、提高工作效率。视力筛查是一个大范围的筛查工作，应用科学有效的视查可以帮助眼科工作者做出初步的临床判断，这对促进儿童眼科保健工作非常重要。

本研究结果显示，男性儿童屈光度异常比例与女性儿童比较，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；各年龄组随着年龄的增加，视力异常和可疑率逐年下降， $P < 0.01$ ，不同年龄组儿童屈光状态分布差异有统计学意义。小于1岁儿童中屈光度异常与其他年龄段比较，屈光度异常发生率最高。儿童睡眠时间受成人影响，入睡晚导致儿童暴露在室内灯光的机会增多，不同的灯光照明对儿童的视力发育造

成一定影响，普通荧光灯比白炽灯和节能灯发病率高，这可能是普通荧光灯频闪更厉害或光线强度不当对眼睛造成危害^[4]，追问病史部分家长有晚上开夜灯睡觉习惯，经指出改正后，半年后或一年后随访大部分转正常。

综上所述，学龄前儿童视力异常率均处于较高水平，学龄前儿童的视力问题不容忽视，应定期给予学龄前儿童进行视力筛查，对发现的异常问题进行早期干预，以免耽误治疗时间，造成严重的视力伤害。做到早发现、早预防、早治疗，同时进行儿童保健的护眼指导、转诊检查治疗。

参 考 文 献

[1] 童梅玲. 儿童早期视力筛查的意义及方法[J]. 中国儿童保健杂志, 2012, 20 (6) :482-484.
 [2] 毛萌, 金星明. 儿童保健与发育行为诊疗规范[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015.
 [3] Alley CL. Preschool vision screening :update on guidelines and techniques[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2013, 24 (5) :415-420.
 [4] 张晓辉. 是什么破坏了宝宝的视力[J]. 时尚育儿, 2012 (2) : 38-39.

收稿日期：2019-06-04

(上接第103页)

急性白血病化疗后中性粒细胞缺乏合并感染患者的疗效[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36 (20) :5064-5066.
 [9] 林雨虹, 吕合作, 吴俊英. GM-CSF/IL-3/IL-5 的免疫调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35 (4) :500-504.
 [10] 甘永安, 刘芳, 王一青, 等. 宫腔灌注粒细胞集落刺激因子对薄型子宫内膜不孕疗效的 Meta 分析[J]. 生殖与避孕, 2016, 36(10): 816-821, 828.
 [11] Aleyasin A, Abediasl Z, Nazari A, et al., Granulocyte colony-stimulating factor in repeated IVF failure, a randomized trial[J]. Reproduction, 2016, 151 :637-642.

[12] 刘茜桐, 卢娜, 李佩, 等. 胚胎反复种植失败的免疫学预测指标[J]. 中华生殖与避孕杂志, 2018, 38 (6) :517-520.
 [13] Decidual natural killer cells and the immune microenvironment at the maternal-fetal interface[J]. Binqing Fu, Haiming Wei. Science China (Life Sciences). 2016 (12) .
 [14] 温惠慧, 纪亚忠. 粒细胞集落刺激因子免疫调节胚胎植入的研究进展[J]. 生殖医学杂志, 2017, 26 (7) :730-734.
 [15] 潘萍, 李予, 杨冬梓. 粒细胞集落刺激因子治疗薄型子宫内膜的研究进展[J]. 实用妇产科杂志, 2017, 33 (1) :20-23.

收稿日期：2019-05-14

(上接第12页)

significance in the population of Polish women[J]. Ginekol Pol, 2015, 86 :742-747.
 [14] Crider KS, Devine, O, Hao L, et al. Population red blood cell folate concentrations for prevention of neural tube defects : Rayesian model[J]. BMJ, 2014, 349 :g4554.
 [15] Bibbins-Domingok, grossman DC, Curry SJ, et al. Folic Acid Supplementation for the prevention of neural tube defects :US preventive services task for recommendation statement[J]. JAMA,

2017, 317 :183-189.
 [16] 中国营养学会. 中国居民膳食指南 2016[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2016.
 [17] Ata B, Urman B. Thrombophilia and assisted reproduction technology any detrimental impact or unnecessary overuse?[J]. J Assist Reprod Genet, 2016, 33 :1305-1310.

收稿日期：2019-09-30